

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 渡邊 友也

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻

## 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 梁 明秀

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 横田俊平

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 谷口英樹

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### The Transcription Factor IRF8 Counteracts BCR-ABL to Rescue Dendritic Cell Development in Chronic Myelogenous Leukemia

#### 慢性骨髄性白血病における転写因子 IRF8 と樹状細胞分化に関する研究

慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia ; CML) は多能性造血幹細胞の形質転換により起こるクローナルな骨髄増殖性疾患である。近年、CML の病因である BCR-ABL に対する分子標的治療薬であるチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitors ; TKI) の開発により、CML 患者の予後は劇的に改善した。しかし、TKIs に抵抗性を有する BCR-ABL 変異体の出現、TKIs が白血病幹細胞に対して効果が不十分なために起こる内服中止による再発、本来 CML は抗腫瘍免疫に対して感受性が高い疾患とされているが、TKIs 自体が抗腫瘍免疫に重要である T 細胞や樹状細胞 (dendritic cell ; DC) の機能を抑制するなどの問題点が依然として残っており、未だに根本的な治療が確立できていない疾患である。血球系特異的転写因子 Interferon Regulatory Factor (IRF) -8 は DC を初めとした免疫細胞の分化制御に重要な役割を果たしている。IRF8 欠損マウスは CML 様病態を呈し、また CML 患者において IRF8 の発現が低下していることから、重要ながん制御因子である事が示唆されている。

本研究では、CML モデルマウスの解析を行い、BCR-ABL が IRF8 の発現を抑制するとともに、DC 分化を阻害していることを見いだした。さらに *in vitro* において IRF8 を共発現することにより、BCR-ABL による DC 分化阻害が解除されることを明らかにし、BCR-ABL による IRF8 の発現抑制が DC 分化不全の原因であることを示した。また、IRF8 によって救済された BCR-ABL 陽性 DC が通常の DC と比較して、高いサイトカイン産生能や抗原提示能をもつことを明らかにした。今回得られた我々の知見から、IRF8 が CML の次世代治療法の標的となる可能性が示された。

審査に当たり以上のような論文内容の説明が行われた後、以下のような質疑応答が行われた。

副査の横田教授より以下の質問がなされた。

1. BCR-ABL、IRF8 を同時に遺伝子導入した樹状細胞において IFN- $\alpha$ の産生が亢進しているが、この産生亢進をもたらしている原因として BCR-ABL による NF- $\kappa$ B の活性化が関与しているように考えられたが、IL-12 はともかく IFN- $\alpha$ は NF- $\kappa$ B と無関係ではないのか。
2. BCR-ABL 陽性樹状細胞の DAMPs, PAMPs 刺激のシグナル伝達は見ないのか？ MyD88、NEMO、IKKB、IRF5 などの因子が抑制されているか検討すべきではないか。
3. BCR-ABL 陽性樹状細胞は抗原提示ができないが NF  $\kappa$  B の活性化は見られる。このことから、細胞の浸潤や炎症の面では BCR-ABL は影響していないか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. IRF8 は形質様樹状細胞の 1 型 IFN 及び L-12 の発現に必須であるという報告がある。しかし、今回の実験系において BCR-ABL、IRF8 を同時に遺伝子導入した樹状細胞において IFN- $\alpha$ の産生が亢進しているのは、1 型 IFN のシグナル伝達経路を考えると NF- $\kappa$ B の発現が亢進しているというよりは BCR-ABL によるリン酸化能などが何らかの関与しているのではないかと考えられる。
2. 今回の実験では LPS, CpG-A, CpG-B などの TLR のリガンドを刺激として用いており、TLR は PAMPs を認識するレセプターである。今回の実験系ではサイトカインの産生という形で樹状細胞の機能を評価しているが、シグナル伝達については詳細に解析はしていない。MyD88、NEMO、IKKB、IRF5 などの因子を詳細に解析することにより、上記で述べた IRF8 で回復した BCR-ABL 陽性樹状細胞のサイトカイン産生亢進の機序が分かる可能性がある。
3. 今回の FLT3L で誘導した BCR-ABL 陽性樹状細胞において NF- $\kappa$ B が発現亢進しているが、実際に CML 患者やマウスモデルでは NF- $\kappa$ B の活性化が認められたとの報告はなく、病態に関与している可能性は低いと考えられる。なお、

CMLにおいてIL-6産生が亢進していることが以前より知られているが、これは炎症というよりは、血球分化においてミエロイド系細胞への分化を誘導する作用をしていると考えられている。

副査の谷口教授より以下の質問がなされた。

1. 前半の移植の実験系では造血幹細胞（LSK）にBCR-ABLを導入しており、非常に病態に沿った洗練された実験系のように思えるが、後半のvitroの樹状細胞培養の実験系では造血前駆細胞（Lin<sup>-</sup>）にBCR-ABLを導入しているのは理由があるのか。
2. 将来的な治療戦略としてCML患者のIRF8の発現を回復させるということであるが、どの前駆細胞が主なターゲットになるのか。
3. LSKにBCR-ABLを遺伝子導入しCMLモデルマウスを作成する方法はよく用いられるのか？また、ヒトCMLを反映しているのか。
4. in vivo CMLモデルマウスでイマチニブ投与は検討したのか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 実際の実験の順番としてvitroの実験を先行して行い、その後に移植系の実験を行っているためである。しかし、vitroの実験系でも数回、LSKにBCR-ABLを導入した後に樹状細胞へと分化させたが、Lin<sup>-</sup>に導入した結果とほぼ同様であった。また移植の実験系においてもLin<sup>-</sup>にBCR-ABLを導入し移植したところ、LSKとほぼ同様のCMLモデルマウスを作成できることを確認しており、実験の本質的には問題ないと考えている。
2. 通常のマウスにおける血球分化では内因性のIRF8発現が単球-樹状細胞前駆細胞（MDP）の段階から高くなるので、分化ということから考えるとMDPという分化段階が主な作用点になるのではと考えている。
3. 以前より報告があり、周知の手法と言える。今回CMLモデルマウスで樹状細胞

胞の減少を示したが、CML 患者の末梢血中でも樹状細胞が減少しているのは当院の第 1 内科と協力した実験でわかっており、一致している。また今回、モデルマウスにおける詳細な血球分化を解析したが、判明している範囲で CML 患者の骨髓前駆細胞の集団とよく似た病態を表している。

4. 既に過去の研究でいくつ実験が行われており、有効性が示されている。

主査の梁教授より以下の質問がなされた。

1. CML では骨髓増殖と分化異常の双方が起こっているが、IRF8 で治るのは分化異常のみなのか。
2. 実際の治療では IRF8 の発現を選択的に回復する薬剤ということではあるが、それ以外に検討している方法はあるのか。
3. 今回の実験で IRF8 で回復した BCR-ABL 陽性樹状細胞が高い細胞傷害性 T 細胞の活性化能を示したが、実際の腫瘍細胞などを用いて抗腫瘍免疫に関しては何か検討したか。
4. IRF8 の発現を選択的に回復できる薬剤ができたとして急性転化時にも作用するか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 移植の実験系では技術的な問題もあり確認できていないため確たることは言えないが、*vitro* の樹状細胞分化誘導系では IRF8 と BCR-ABL を同時に遺伝子導入した細胞では増殖率はわずかに低下したのみであった。IRF8 の遺伝子導入効率が高ければ抑えられる可能性はあると考えられる。
2. 現在実際の医療で行われている治療法に樹状細胞療法がある。これは患者の末梢血より単球を採取し、サイトカインを加えて樹状細胞へ分化し再度体内に戻すことによって免疫機能を強化する方法である。同様の方法を CML 患

者に行い、樹状細胞に IRF8 を遺伝子導入した上で、患者に戻すことで、通常よりもより高い効果がでる可能性があると考えられる。

3. 今回の実験ではそこまでの評価はできていない。将来的には必ず評価することが必要な実験と考えられる。
4. 治療のコンセプトとしては IRF8 を回復することにより抗腫瘍免疫を活性化し、なおかつ腫瘍細胞を減少させる効果を狙ったものなので、可能性はないとは言えないが現時点でははっきりしたことは言えない。

この他にもいくつか質問がなされたが、いずれも適切な返答がなされた。以上より本論文は CML の病態を IRF8 と DC という観点から解析し、新たな知見を示したものであり、博士（医学）の学位に値するものと判定された。